

9/508238

514 Rec'd PCT/PTO 09 MAR 2000

**Nucleinsäure-Sequenzen und Verfahren zum Nachweis von  
Bakterien der Gattung *Pseudomonas***

Die Erfindung betrifft Nucleinsäuremoleküle für *Pseudomonas*-Nachweis, einen Kit sowie deren Verwendungen.

**Allgemeiner Hintergrund der Erfindung**

Das gram-negative Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* ist ein weit-verbreitetes, für den Menschen pathogenes Bakterium, das vor allem für Neugeborene und abwehrgeschwächte Menschen ein hohes gesundheitliches Risiko darstellt. Neben seiner hohen klinischen Relevanz, der häufig vorhandenen Antibiotikaresistenzen und der Bildung von Toxinen, insbesondere des hochgiftigen Exotoxins A (Woods, D.E. and Iglewski, B.H., Rev. Infect. Dis. 5, 714-722 (1983), ist *Pseudomonas aeruginosa* einer der bedeutendsten, bakteriellen Verursacher von Lebensmittelvergiftungen. Für den Nachweis von

*Pseudomonas aeruginosa* werden mittels konventioneller Verfahren mindestens 4 Tage benötigt. Die Entwicklung schneller Nachweisverfahren von *Pseudomonas aeruginosa* in Lebensmitteln und klinischen Proben ist daher dringend erforderlich.

Für den routinemäßigen Einsatz zur Erfassung einzelner Mikroorganismen sind in den letzten Jahren eine Reihe neuer Methoden entwickelt worden. Hierzu zählen immunologische Verfahren, die auf dem Einsatz polyvalenter oder monoklonaler Antikörper beruhen und Verfahren, bei denen Nucleinsäure-Sonden zum Nachweis mittels Hybridisierung an keimspezifische Nucleinsäuren eingesetzt werden. Als weitere Methoden werden diejenigen Verfahren beschrieben, die auf einer spezifischen Nucleinsäure-Amplifikation basieren, mit oder ohne anschließende Bestätigungsreaktion durch Nucleinsäure-Hybridisierung. Eingesetzte Verfahren zur Amplifikation von Nucleinsäuren sind z.B. die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) [US Patente 4,683,195; 4,683,202; und 4,965,188], die Ligase-Kettenreaktion [WO Veröffentlichung 89/09835], die "self-sustained sequence replication" [EP 329,822], das "transcription based amplification system" [EP 310,229] und das Q $\beta$  RNA-Replikase-System [US Patent 4,957,858].

Die genannten Verfahren auf Nucleinsäure-Basis sind so sensitiv, daß, anders als bei konventionellen mikrobiologischen Verfahren, eine langwierige Anreicherung des nachzuweisenden Mikroorganismus aus der zu untersuchenden Probe entfällt oder stark verkürzt werden kann. Eine Untersuchung auf An- oder Abwesenheit des jeweiligen Mikroorganismus ist daher bei Anwendung der genannten Verfahren auf Nucleinsäure-Basis in der Regel innerhalb eines Tages abgeschlossen. Insbesondere wenn für den Nachweis mittels konventioneller Verfahren mehrere Tage bis Wochen

benötigt werden, wird hierdurch eine erhebliche Zeitverkürzung erreicht.

Es sind verschiedene Verfahren auf PCR-Basis zum Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* beschrieben. Mittels Amplifikation einer 369 bp langen DNA-Region aus dem Exotoxin A-Gen konnte selektiv die Anwesenheit von Stämmen der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* nachgewiesen werden [Khan et al. (1994), Appl. Environ. Microbiol. 60, 3739-3745]. Zwar wurden mit diesem PCR-System keine Bakterien anderer Spezies erfaßt, jedoch konnte nur bei 96% der insgesamt 130 getesteten *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme ein Amplifikat beobachtet werden. Dieses PCR-System ist somit nur bedingt für die Etablierung eines Schnellverfahrens geeignet, mit dem die Anwesenheit aller Stämme von *Pseudomonas aeruginosa* zuverlässig nachgewiesen werden kann.

Mit Hilfe eines weiteren, kürzlich veröffentlichten, auf einer Multiplex-PCR basierenden Verfahrens gelang der selektive Nachweis von fluoreszierenden Pseudomonaden einerseits und *Pseudomonas aeruginosa* andererseits [De Vos et al (1997), J. Clin. Microbiol. 35, 1295-1299]. Jedes der insgesamt 150 getesteten Isolate von *Pseudomonas aeruginosa* konnte mit diesem Verfahren erfaßt werden. Nachteilig ist jedoch, daß das für die selektive Erfassung von *Pseudomonas aeruginosa* herangezogene *oprL*-Gen auch in anderen Spezies der Gattung *Pseudomonas* hochkonserviert ist. So sind die Aminosäuren, die im Bereich der Bindungsstellen der von Voss et al. verwendeten Primer kodiert werden, in *Pseudomonas putida* und *Pseudomonas aeruginosa* identisch. Der Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* beruht somit lediglich auf einigen wenigen unterschiedlichen Basenpaaren bedingt durch die Variation der dritten Position einzelner Aminosäurecodons. Dies birgt erfahrungsgemäß eine große Gefahr des Auftretens von falsch-positiven bzw. falsch negativen Ergebnissen.

Das beschriebene Multiplex-PCR-System bietet zudem wegen der hohen Konservierung der *oprI* und *oprl*-Gene wohl kaum die Möglichkeit, durch z.B. Einsatz verschiedener Sonden im Anschluß an die PCR-Reaktion, auch andere klinisch relevante Spezies der Gattung *Pseudomonas* nachzuweisen, wie z.B. *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas putida* oder *Pseudomonas stutzeri*.

Ziel der hier dargestellten Erfindung war die Etablierung von Nucleinsäuresequenzen, deren Einsatz als Primer und/oder Sonden eine möglichst vollständige Erfassung aller Vertreter der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* sicherstellt. Ein weiteres Ziel der Erfindung war das Auffinden eines Genom-Bereiches, der innerhalb verschiedener Spezies der Gattung *Pseudomonas* ausreichend hohe Sequenz-Variabilität aufweist, um optional auch den Nachweis anderer Spezies der Gattung *Pseudomonas* zu ermöglichen, z.B. durch Einsatz verschiedener Varianten von Primern und/oder Sonden in der PCR bzw. im Anschluß an die PCR.

Je nach Größe der zu detektierenden Gruppe von Mikroorganismen und evolutionäre Verwandtschaft (Ähnlichkeit) von abzugrenzenden (nicht zu erfassenden) Mikroorganismen erfordert ein auf differentiellen DNA-Sequenzen basierender Nachweis sehr umfangreiche Vorarbeiten, um jeweils geeignete DNA-Sequenzen mit der gewünschten Spezifität zu finden. Die hier dargelegte Erfindung betrifft solche DNA-Sequenzen, mit denen der Schnellnachweis von Bakterien der Gattung *Pseudomonas*, insbesondere von *Pseudomonas aeruginosa* möglich ist.

#### **Beschreibung der Erfindung**

Gemäß einer Ausführungsform wird die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe durch ein Nucleinsäuremolekül gelöst,

das dadurch gewinnbar ist, daß man von mehreren Stämmen ausgeht, die einerseits einer nachzuweisenden Gruppe von Bakterien des Genus *Pseudomonas* und andererseits nicht-nachzuweisenden Bakterien angehören,

- (a) in an sich bekannter Weise aus einem *Pseudomonas*-Stamm dieser Gruppen (erster Stamm) genomische DNA isoliert,
- (b) in an sich bekannter Weise die 23S/5S-intergenische Region gegebenenfalls mit dem direkt angrenzenden 23S-Bereich und/oder dem direkt angrenzenden 5S-Bereich amplifiziert und das Amplifikationsprodukt gewinnt (erstes Amplifikationsprodukt),
- (c) mit einem zweiten, dritten,..... und/oder nten *Pseudomonas*-Stamm dieser Gruppen jeweils gemäß Stufen (a) und (b) genomische DNA isoliert, die 23S/5S- intergenische Region gegebenenfalls mit dem direkt angrenzenden 23S-Bereich und/oder dem direkt angrenzenden 5S-Bereich amplifiziert und das Amplifikationsprodukt gewinnt (zweites, drittes, ..... ntes Amplifikationsprodukt),
- (d) in an sich bekannter Weise die DNA-Sequenz von gemäß (b) und (c) gewonnenen Amplifikationsprodukten bestimmt und die DNA-Sequenz des Amplifikationsproduktes gemäß (b) mit der DNA-Sequenz eines oder mehrerer Amplifikationsprodukte gemäß (c) vergleicht und
- (e) als Primer oder als Sonde ein Nucleinsäuremolekül in an sich bekannter Weise gewinnt, mit dessen Hilfe sich die nachzuweisende Gruppe von Bakterien des Genus *Pseudomonas* von der nicht-nach-zuweisenden Gruppe von Bakterien des Genus *Pseudomonas* anhand von Unterschieden an mindestens einer Nukleotidposition im Sequenzbereich des Nucleinsäuremoleküls unterscheiden läßt.

Das erfindungsgemäße Nucleinsäuremolekül kann dadurch gewinnbar sein, daß man von Stämmen ausgeht, die einerseits nachzuweisenden Bakterien des Genus *Pseudomonas* und andererseits nicht nachzuweisenden Bakterien eines anderen

Genus (anderer Genera) als *Pseudomonas* angehören.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform wird die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe durch ein Nucleinsäuremolekül gelöst, das dadurch gewinnbar ist, daß man von mehreren Stämmen ausgeht, die einer nachzuweisenden und einer nicht-nachzuweisenden Gruppe von Bakterien des Genus *Pseudomonas* angehören,

- (a) in an sich bekannter Weise aus einem *Pseudomonas*-Stamm dieser Gruppen (erster Stamm) genomische DNA isoliert,
- (b) in an sich bekannter Weise die 23S/5S-intergenische Region gegebenenfalls mit dem direkt angrenzenden 23S-Bereich und/oder dem direkt angrenzenden 5S-Bereich amplifiziert und das Amplifikationsprodukt gewinnt (erstes Amplifikationsprodukt),
- (c) mit einem zweiten, dritten,..... und/oder nten *Pseudomonas*-Stamm dieser Gruppen jeweils gemäß Stufen (a) und (b) genomische DNA isoliert, die 23S/5S- intergenische Region mit dem direkt angrenzenden 23S-Bereich und/oder dem direkt angrenzenden 5S-Bereich amplifiziert und das Amplifikationsprodukt gewinnt (zweites, dritttes, ..... ntes Amplifikationsprodukt),
- (d) in an sich bekannter Weise die DNA-Sequenz von gemäß (b) und (c) gewonnenen Amplifikationsprodukten bestimmt und die DNA-Sequenz des Amplifikationsproduktes gemäß (b) mit der DNA-Sequenz eines oder mehrerer Amplifikationsprodukte gemäß (c) vergleicht und
- (e) als Primer oder als Sonde ein Nucleinsäuremolekül in an sich bekannter Weise gewinnt, mit dessen Hilfe sich die nachzuweisende Gruppe von Bakterien des Genus *Pseudomonas* von der nicht-nach-zuweisenden Gruppe von Bakterien des Genus *Pseudomonas* anhand von Unterschieden an mindestens einer Nukleotidposition im Sequenzbereich des Nucleinsäuremoleküls unterscheiden läßt.

Das erfindungsgemäße Nucleinsäuremolekül kann dadurch gewinnbar sein, daß man von Stämmen ausgeht, die einer nachzuweisenden Gruppe von Bakterien der Species *Pseudomonas aeruginosa* und einer nicht-nachzuweisenden Gruppe von Bakterien anderer Species angehören.

Ferner betrifft die Erfindung ein Nucleinsäuremolekül der SEQ ID NO 1 oder der hierzu komplementären Sequenz.

Ferner betrifft die Erfindung ein derartiges Nucleinsäuremolekül mit einer gegenüber dem vorstehenden Nucleinsäuremolekül verkürzten Sequenz, und zwar der Sequenz des Bereiches oder im Bereich der Nukleotidpositionen 12 bis 131.

Ferner betrifft die Erfindung ein derartiges Nucleinsäuremolekül mit einer gegenüber einem Nucleinsäuremolekül der SEQ ID NO 1 verkürzten Sequenz, nämlich

- (i) der SEQ ID NO 3 oder
- (ii) der SEQ ID NO 4 oder
- (iii) der SEQ ID NO 5 oder
- (iv) der zu (i), (ii) und (iii) jeweils komplementären Sequenz.

Ferner betrifft die Erfindung ein Nucleinsäuremolekül der SEQ ID NO 2 oder der hierzu komplementären Sequenz.

Ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül kann dadurch gekennzeichnet sein, daß es hinsichtlich seiner Sequenz bei mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden seiner Nukleotidkette

- (i) mit einem Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche identisch ist oder
- (ii) in 9 von 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden mit einem

- Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche übereinstimmt oder
- (iii) in 8 von 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden mit einem Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche übereinstimmt oder
- (iv) zu mindestens 90 % mit einem Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche homolog ist.

Ein derartiges erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül kann dadurch gekennzeichnet sein, daß es 10 bis 250 und vorzugsweise 15 bis 30 Nukleotide lang ist.

Ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül kann dadurch gekennzeichnet sein, daß es einzelsträngig oder doppelsträngig vorliegt.

Ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül kann dadurch gekennzeichnet sein, daß es

- (i) als DNA oder  
(ii) als (i) entsprechende RNA oder  
(iii) als PNA vorliegt,

wobei das Nucleinsäuremolekül gegebenenfalls in einer für analytische Nachweisverfahren, insbesondere auf Basis von Hybridisierung und/oder Amplifizierung, an sich bekannten Weise modifiziert ist.

So kann ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül dadurch modifiziert sein, daß bis zu 20 % der Nukleotide von mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden seiner Nukleotidkette, insbesondere 1 oder 2 Nukleotide, durch für Sonden und/oder Primer an sich bekannte analoge Bausteine ersetzt sind, insbesondere durch Nukleotide, die bei Bakterien nicht natürlich vorkommen.

Ferner kann das erfindungsgemäße Nucleinsäuremolekül dadurch oder zusätzlich dadurch modifiziert bzw. markiert sein, daß es in einer für analytische Nachweisverfahren an sich bekannten Weise eine oder mehrere radioaktive Gruppen, farbige Gruppen, fluoreszierende Gruppen, Gruppen zur Immobilisierung an fester Phase und/oder Gruppen für eine indirekte oder direkte Reaktion, insbesondere eine enzymatische Reaktion, insbesondere mit Hilfe von Antikörpern, Antigenen, Enzymen und/oder Substanzen mit Affinität zu Enzymen oder Enzymkomplexen, und/oder anderweitig modifizierende oder modifizierte Gruppen nucleinsäureähnlichen Aufbaus aufweist.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform wird die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe durch einen Kit für analytische Nachweisverfahren gelöst, insbesondere zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Pseudomonas*, wobei der Kit gekennzeichnet ist durch ein oder mehrere erfindungsgemäße Nucleinsäuremoleküle.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform wird die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe durch eine Verwendung von einem oder mehreren erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen oder eines erfindungsgemäßen Kits zum Nachweis der An- oder Abwesenheit von Bakterien gelöst, welche einer Gruppe von Bakterien der Gattung *Pseudomonas* angehören.

Die erfindungsgemäße Verwendung kann dadurch gekennzeichnet sein, daß die Gruppe von Bakterien der Gattung *Pseudomonas* verschiedene Stämme von *Pseudomonas aeruginosa* umfaßt oder durch diese Stämme gebildet wird.

Eine derartige erfindungsgemäße Verwendung kann dadurch gekennzeichnet sein, daß es sich bei der Gruppe von Bakterien der Gattung *Pseudomonas* ausschließlich um *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme handelt.

Ferner kann eine erfindungsgemäße Verwendung dadurch gekennzeichnet sein, daß man eine Nucleinsäurehybridisierung und/oder eine Nucleinsäureamplifikation durchführt.

Ferner kann eine erfindungsgemäße Verwendung dadurch gekennzeichnet sein, daß man eine Polymerase-Kettenreaktion als Nucleinsäureamplifikation durchführt.

Ferner kann eine erfindungsgemäße Verwendung dadurch gekennzeichnet sein, daß man den Nachweis dadurch durchführt, daß man die nachzuweisenden Bakterien von nicht-nachzuweisenden Bakterien anhand von Unterschieden der genomischen DNA und/oder RNA an mindestens einer Nukleotidposition im Bereich eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls unterscheidet.

Ferner kann eine erfindungsgemäße Verwendung dadurch gekennzeichnet sein, daß man anhand von Unterschieden im Bereich eines Nucleinsäuremoleküls der SEQ ID NO 1 oder der hierzu komplementären Sequenz unterscheidet.

Zur Detektion von spezifischen Mikroorganismen mittels Nucleinsäure-Hybridisierung oder -Amplifikation werden erfindungsgemäß also keimspezifische Oligonukleotide eingesetzt. **Keimspezifische Oligonukleotide** sind Nucleinsäuren, 10 bis 250 Basen (vorzugsweise 15 bis 30 Basen) lang, deren Basensequenz charakteristisch für einen spezifischen Mikroorganismus oder eine Gruppe von Mikroorganismen ist. Eine Hybridisierung an DNA bzw. eine Amplifikation von DNA bei Einsatz dieser keimspezifischen Oligonukleotide (z.B. als Primer oder Sonden) mit den oben genannten Verfahren kann, unter geeigneten Reaktionsbedingungen, nur dann erfolgen, wenn die DNA der jeweils nachzuweisenden Mikroorganismen anwesend ist.

Prokaryontische Ribosomen beinhalten drei distinkte Nucleinsäurekomponenten, welche allgemein als 5S, 16S und 23S rRNA (ribosomale Ribonucleinsäure) bekannt sind. Die genetische Information für diese Ribonucleinsäuren (rDNA) ist im Genom typischerweise in Form von Tandems angeordnet. Die Organisation einer solchen Einheit ist 16S-23S-5S, wobei die drei Gene durch kurze hypervariable intergenische Regionen voneinander getrennt sind. Die Einheiten sind im Genom mehrfach vorhanden, wobei die Anzahl der sich wiederholenden Einheiten in verschiedenen Bakterien variieren kann. Die hohe Konservierung der DNA-Sequenz im Bereich der 16S rDNA, der 23S rDNA und der 5S rDNA über das gesamte Bakterienreich ermöglicht ein Design von **nicht-spezifischen Oligonukleotiden** auch ohne genaue Kenntnis der DNA-Sequenzen der zu untersuchenden Mikroorganismen. Solche nicht-spezifischen Oligonukleotide sind charakteristisch für eine größere, in der Regel phylogenetisch verwandte Gruppe von Mikroorganismen. Durch Einsatz dieser nicht-spezifischen Oligonukleotide gelingt dem Fachmann, z.B. nach entsprechenden Vorversuchen durch DNA-Amplifikation mittels PCR, die Isolation von rDNA-Fragmenten, z.B. der 23S/5S intergenischen Region eines beliebigen Mikroorganismus. Durch DNA-Sequenzierung kann dann die Sequenz der hypervariablen intergenischen Regionen des betreffenden Mikroorganismus bestimmt werden.

DNA-Sequenzierung der 23S/5S intergenischen Region einer möglichst großen Anzahl **nachzuweisender** Bakterien (z.B. von verschiedenen *Pseudomonas*-Spezies) einerseits und nachfolgender Vergleich dieser DNA-Sequenzen andererseits erlauben das Auffinden von DNA-Bereichen, die in der untersuchten Gruppe (z.B. alle *Pseudomonas*-Spezies) nicht oder nur unwesentlich verändert ist.

DNA-Sequenzierung der 23S/5S intergenischen Region ausgewählter **nicht-nachzuweisender** Bakterien (z.B. Bakterien die nicht zur Gattung *Pseudomonas* gehören) einerseits und nachfolgender Vergleich dieser DNA-Sequenzen mit der Sequenz der nachzuweisenden Bakterien (z.B. verschiedener *Pseudomonas*-Spezies) andererseits erlaubt das Auffinden von DNA-Sequenzen, die für die nachzuweisenden Bakterien (z.B. alle *Pseudomonas*-Spezies) charakteristisch sind. Aus diesen DNA-Sequenzen können wiederum Oligonukleotide abgeleitetet werden, die als Primer und/oder Sonden in auf Nucleinsäuren basierenden Verfahren einsetzbar sind, mit dem Ziel, die jeweilige Gruppe von Bakterien (z.B. alle Spezies der Gattung *Pseudomonas*) spezifisch nachzuweisen.

Die in der vorliegenden Erfindung beschriebenen DNA-Sequenzen zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Pseudomonas*, insbesondere Bakterien der Spezies *Pseudomonas aeruginosa*, basieren auf der 23S/5S intergenischen Region und dem direkt angrenzenden Bereich der 23S rDNA. Die DNA-Sequenz in dieser Region wurde für eine Vielzahl von Bakterien bestimmt. Nach exakten Sequenzvergleichen wurden keimspezifische Nucleinsäuresequenzen bestimmt, für Primer und/oder Sonden für einen Einsatz in einem Spezies-/Genus-spezifischen Nachweisverfahren benutzt werden können.

Zum Nachweis der jeweiligen Gruppe von Mikroorganismen werden Nucleinsäuren, vorzugsweise genomische DNA, zunächst aus den in einer zu untersuchenden Probe bzw. Bakterienkultur enthaltenen Zellen freigesetzt. Mittels Nucleinsäurehybridisierung kann dann, und zwar unter Einsatz der erfindungsgemäßen keimspezifischen Oligonukleotide als Sonde, der **direkte** Nachweis von keimspezifischen Nucleinsäuresequenzen in der zu untersuchenden Probe erfolgen. Geeignet hierzu sind verschiedene dem Fachmann bekannte Verfahren, wie z.B. "Southern blot" oder "dot blot".

Bevorzugt ist jedoch, vor allem wegen der höheren Empfindlichkeit, ein indirektes Nachweisverfahren, bei dem die gesuchten DNA/RNA-Sequenzen zunächst mittels der o.g. Verfahren zur Amplifikation von Nucleinsäuren, vorzugsweise PCR, amplifiziert werden.

Die Amplifikation von DNA/RNA unter Verwendung der genannten Verfahren kann unter Einsatz von keimspezifischen Oligonukleotiden als Primer erfolgen. Dabei werden nur in dem Fall spezifische Amplifikate gebildet, in dem DNA/RNA des nachzuweisenden Mikroorganismus anwesend ist. Durch eine nachgeschaltete Detektionsreaktion unter Verwendung von keimspezifischen Oligonukleotiden als Sonden kann die Spezifität des Nachweisverfahrens erhöht werden. Für diese nachgeschaltete Detektionsreaktion ist ebenso die Verwendung von nicht-keimspezifischen Oligonukleotiden möglich.

Alternativ kann die Nucleinsäure-Amplifikation auch in Anwesenheit eines oder mehrerer nicht-spezifischer Oligonukleotide durchgeführt werden, so daß möglicherweise auch DNA/RNA anderer, nicht-nachzuweisender Mikroorganismen amplifiziert werden kann. Ein derartiges Amplifikationsverfahren ist in der Regel weniger spezifisch und sollte daher durch eine nachfolgende Detektionsreaktion mit einem oder mehreren keimspezifischen Oligonukleotid(en) als Sonde(n) abgesichert werden.

Dem Fachmann sind verschiedene Verfahren bekannt, mit denen die bei den indirekten Verfahren entstehenden Amplifikationsprodukte nachgewiesen werden können. Dazu gehören u.a. die Visualisierung mittels Gelelektrophorese, die Hybridisierung von Sonden an immobilisierte Reaktionsprodukte [gekoppelt an Nylon- oder Nitrocellulose-Filter ("Southern blots") oder z.B. an "beads" oder Mikrotiterplatten] und die

Hybridisierung der Reaktionsprodukte an immobilisierte Sonden (z.B. "reverse dot blots" oder mit Sonden gekoppelte "beads" oder Mikrotiterplatten).

Es sind eine Vielzahl verschiedener Varianten beschrieben, mit denen keimspezifische Oligonukleotide (z.B. Sonden und Primer) für die beschriebenen direkten oder indirekten Nachweisverfahren markiert bzw. modifiziert werden können. So können diese beispielsweise radioaktive, farbige, fluoreszierende oder anderweitig modifizierte bzw. modifizierende Gruppen enthalten, beispielsweise Antikörper, Antigene, Enzyme bzw. andere Substanzen mit Affinität zu Enzymen oder Enzymkomplexen. Sonden bzw. Primer können entweder natürlich vorkommende oder synthetisch hergestellte doppelsträngige oder einzelsträngige DNA oder RNA sein bzw. modifizierte Formen von DNA oder RNA, wie z.B. PNA (bei diesen Molekülen sind die Zucker-Einheiten durch Aminosäuren oder Peptide ausgetauscht). Einzelne oder mehrere Nukleotide der Sonden oder Primer können gegen analoge Bausteine (wie z.B. Nukleotide, die in der Ziel-Nucleinsäure nicht natürlich vorkommen) ersetzt sein. Bei den o.g. indirekten Nachweisverfahren kann Detektion auch über ein intern-markiertes Amplifikat geführt werden. Dies kann z.B. über den Einbau von modifizierten (z.B. an Digoxigenin oder an Fluorescein gekoppelten) Nukleosidtriphosphaten während der Amplifikationsreaktion erfolgen.

Geeignet als erfindungsgemäße keimspezifische Oligonukleotide sind Nucleinsäuren, vorzugsweise 10 bis 250 Basen und insbesondere 15 bis 30 Basen lang, die mindestens in einer 10 Basen langen Sequenz mit den unten angegebenen Sequenzen 1 bis 5 oder den hierzu komplementären Sequenzen übereinstimmen. Geringere Abweichungen (1 bis 2 Basen) in dieser 10 Basen langen Sequenz sind möglich, ohne daß die jeweils angegebene Spezifität bei der Amplifikation und/oder Hybridisierung

verloren geht. Dem Fachmann ist bekannt, daß im Falle solcher geringeren Abweichungen die Reaktionsbedingungen entsprechend verändert werden müssen; vgl. beispielsweise T. Maniatis, Molecular Cloning, Herausgeber G. Sambrook & E.F. Fritsch, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.

Die Sequenz von *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) im Bereich der 23S/5S intergenischen Region lautet:

(Sequenz 1 = SEQ ID NO 1))

ATAACACCCAAACAATCTGAYGATTGTGTGTTGTAAGGTGAAGTCGACGAACCGAAAGTCG  
CATGAACCGCAAACACCTTGAAATCACATAACCTGAATCCGGATAGACGTAAGCCCCAAGCGAA  
CGGATAT

Außerdem wurde die Sequenz im Bereich der 23S/5S-intergenischen Region für 6 weitere Stämme der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* sowie für mindestens je einen Stamm der folgenden Spezies bestimmt: *Pseudomonas asplenii*, *Pseudomonas citronellosis*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas syringae*. Die Sequenzvergleiche ergaben, daß sich mehrere, von Sequenz 1 abgeleitete Oligonukleotide für den selektiven Nachweis von Bakterien der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* eignen. Geeignet für solche keimspezifischen Oligonukleotide ist die Sequenz der Region (12-131).

Von Sequenz 1 wurden folgende, als Primer für die PCR (Sequenz 3 und 5) und als Sonde (Sequenz 4), besonders geeignete Oligonukleotide abgeleitet.

Oligonukleotid Pal (Sequenz 2) entspricht Position 2823-2842 eines 23S rRNA-Gens von *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 [Toschka et al. (1987), Nucleic Acids. Res. 15, 7182]:

Oligonukleotid Pa1: (Sequenz 2 = SEQ ID NO 2) 5'-  
GATAGGCTGGGTGTGTAAGC-3'

Oligonukleotid Pa2: (Sequenz 3 = SEQ ID NO 3) 5'-  
CTTGGGCTTACGTCTATCCG-3'

Oligonukleotid Pa3: (Sequenz 4 = SEQ ID NO 4) 5'-TTCAGGTATG  
TGATTCAAG GTG-3'

Oligonukleotid Pa4: (Sequenz 5 = SEQ ID NO 5) 5'-  
GACGATTGTGTGTTGTAAGGTGA

**Beispiel 1:** Nachweis von Bakterien der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* mit der Polymerase-Kettenreaktion

Aus Reinkulturen der in Tabelle 1 aufgeführten Bakterien wurde DNA mittels Standardverfahren isoliert. Je ca. 10 bis 100 ng dieser DNA-Präparationen wurde dann in Gegenwart von je 0,4 µM Oligonukleotid Pa1 und Pa2 oder Pa4 und Pa2, 200 µM dNTP's (Boehringer Mannheim), 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 67 mM Tris/HCl (pH 8,8), 0,01 % Tween 20 und 0,03 U/µl Taq-Polymerase (Biomaster) in die PCR eingesetzt. Die PCR wurde in einem Perkin-Elmer 9600 (Pa1 und Pa2) / Biometra TRIO-Thermoblock (Pa4 und Pa2) Thermocycler mit den nachfolgend aufgeführten Thermoprofilen durchgeführt:

a) Amplifikation mit Oligonukleotid Pa1 und Pa2

- initiale Denaturierung	95 °C	5 min
- 1. Amplifikation (15 Zyklen)	94 °C	35 sek
	68 °C	30 sek
	72 °C	30 sek
- 2. Amplifikation (20 Zyklen)	94 °C	35 sek
	64 °C	30 sek
	72 °C	30 sek

- finale Synthese                    72 °C            5 min

b) Amplifikation mit Oligonukleotid Pa4 und Pa2

- initiale Denaturierung            95 °C            5 min

- Amplifikation (35 Zyklen)

95 °C	30 sek
62 °C	30 sek
72 °C	20 sek

- finale Synthese                    72 °C            5 min

Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurden die Amplifikationsprodukte mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Anfärbung mit Ethidiumbromid visualisiert. Die erwarteten Produkte von 191 bp /102 bp Länge wurden nur in den Fällen beobachtet, in denen DNA von Stämmen der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* anwesend war (vergleiche Tabelle 1), nicht aber bei Anwesenheit von DNA der anderen getesteten Bakterien. Nach Beendigung des Laufes wurde die in den Gelen enthaltene DNA mittels Standard-Methoden auf Nylon-Filter transferiert und zur Überprüfung der Spezifität mit dem am 5'-Ende biotinylierten Oligonukleotid Pa3 (Sequenz 4) hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte in 5 x SSC, 2 % Blocking Reagenz, 0,1 % Laurylsarcosin, 0,02 % SDS und 5 pmol/ml Sonde für 4 h bei 48°C. Gewaschen wurde in 2 x SSC, 0,1 % SDS für 2 x 5 min bei Raumtemperatur und in 2 x SSC, 0,1 % SDS für 1 x 15 min bei 48°C. Die Detektion erfolgte nach Standard-Methoden mittels Alkalischer Phosphatase-Konjugate (Extravidin, Fa SIGMA, # E-2636) in Anwesenheit von 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat und 4-Nitro-Blue Tetrazoliumchlorid (Fa. Boehringer Mannheim).

Auf den Filtern wurde nur in den Fällen eine Bande beobachtet, in denen zuvor auch eine Bande auf dem Agarose-Gel sichtbar war (siehe Tabelle 1). Somit wurde mittels PCR und mittels Hybridisierung die Anwesenheit sämtlicher der 86 getesteten *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme nachgewiesen. Hingegen wurde keiner der getesteten nicht zu dieser Spezies gehörenden Bakterienstämme mit diesem System erfaßt.

Tabelle 1: Resultate der PCR-Amplifikation mit den Oligonukleotiden Pa1/Pa2 (SEQ ID NO 2 und SEQ ID NO 3) und Pa4/Pa2 (SEQ ID NO 5 und SEQ ID NO 3) und nachfolgender Hybridisierung mit dem Oligonukleotid Pa3 (SEQ ID NO 4).

Spezies	Stammbezeichnung	Pa1/Pa2	Pa4/Pa2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 10145	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 14886	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15522	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15691	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15692	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 21472	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 21776	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 33350	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 33361	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 33818	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 33988	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LMG 8029	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 288	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 939	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 1117	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 1253	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 1299	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 682	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 4283	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 4880	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 4937	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 4938	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5258	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5594	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5595	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5596	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5597	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5598	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5599	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5600	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5601	+	+

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5602	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5603	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5604	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5606	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5607	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5917	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5918	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5919	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5920	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5921	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5922	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5923	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5924	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5925	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5926	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5927	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5928	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5929	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5930	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5932	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5933	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5934	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7046	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7047	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7048	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7049	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7050	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7051	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7052	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7053	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7054	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7055	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7056	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7057	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7058	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7059	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7060	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7061	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7062	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7063	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7064	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7065	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7066	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7067	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7068	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7069	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7070	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7071	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7072	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7073	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7474	n.d.	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7475	n.d.	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 8468	n.d.	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 8493	n.d.	+

<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	DSM 50342	-	-
<i>Pseudomonas asplenii</i>	DSM 50254	-	-
<i>Pseudomonas cepacia</i>	BC 3134	-	-
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	BC 1753	-	-
<i>Pseudomonas citronellosis</i>	DSM 50332	-	-
<i>Pseudomonas corrugata</i>	DSM 7228	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	BC 950	n.d.	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	BC 4882	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	BC 2439	-	-
<i>Pseudomonas fragi</i>	DSM 3456	-	-
<i>Pseudomonas indigofera</i>	BC 1105	n.d.	-
<i>Pseudomonas mendocina</i>	DSM 50017	-	-
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	DSM 1045	-	-
<i>Pseudomonas pickettii</i>	BC 3323	-	-
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	DSM 50188	-	-
<i>Pseudomonas putida</i>	BC 4941	-	-
<i>Pseudomonas putida</i>	DSM 291	-	-
<i>Pseudomonas putida</i>	DSM 548	-	-
<i>Pseudomonas putida</i>	DSM 549	n.d.	-
<i>Pseudomonas putida</i> ( <i>ovalis</i> )	ATCC 950	-	-
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	BC 4940	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i>	DSM 10604	-	-
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	DSM 4593	-	n.d.
<i>Enterobacter aerogenes</i>	DSM 30053	-	n.d.
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	-	n.d.
<i>Escherichia hermanii</i>	DSM 4560	-	n.d.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BC 5362	-	n.d.
<i>Klebsiella terrigena</i>	BC 4700	-	n.d.
<i>Proteus vulgaris</i>	DSM 2024	-	n.d.
<i>Providencia stuartii</i>	BC 5950	-	n.d.
<i>Salmonella Anatum</i>	BC 2284	-	n.d.

BC: BioteCon-Stammsammlung, n.d.: nicht durchgeführt.

**Patentansprüche**

1. Nucleinsäuremolekül, dadurch gewinnbar, daß man von mehreren Stämmen ausgeht, die einerseits einer nachzuweisenden Gruppe von Bakterien des Genus *Pseudomonas* und andererseits nicht-nachzuweisenden Bakterien angehören,
  - (a) in an sich bekannter Weise aus einem Stamm der genannten Bakterien (erster Stamm) genomische DNA isoliert,
  - (b) in an sich bekannter Weise die 23S/5S-intergenische Region gegebenenfalls mit dem direkt angrenzenden 23S-Bereich und/oder dem direkt angrenzenden 5S-Bereich amplifiziert und das Amplifikationsprodukt gewinnt (erstes Amplifikationsprodukt),
  - (c) mit einem zweiten, dritten,..... und/oder nten Stamm der genannten Bakterien jeweils gemäß Stufen (a) und (b) genomische DNA isoliert, die 23S/5S- intergenische Region gegebenenfalls mit dem direkt angrenzenden 23S-Bereich und/oder dem direkt angrenzenden 5S-Bereich amplifiziert und das Amplifikationsprodukt gewinnt (zweites, drittes, ..... ntes Amplifikationsprodukt),
  - (d) in an sich bekannter Weise die DNA-Sequenz von gemäß (b) und (c) gewonnenen Amplifikationsprodukten bestimmt und die DNA-Sequenz des Amplifikationsproduktes gemäß (b) mit der DNA-Sequenz eines oder mehrerer Amplifikationsprodukte gemäß (c) vergleicht und
  - (e) als Primer oder als Sonde ein Nucleinsäuremolekül in an sich bekannter Weise gewinnt, mit dessen Hilfe sich die nachzuweisende Gruppe von Bakterien des Genus *Pseudomonas* von nicht-nachzuweisenden Bakterien anhand von Unterschieden an mindestens einer Nukleotidposition im Sequenzbereich des Nucleinsäuremoleküls unterscheiden läßt.

2. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, dadurch gewinnbar, daß man von Stämmen ausgeht, die einerseits nachzuweisenden

Bakterien des Genus *Pseudomonas* und andererseits nicht nachzuweisenden Bakterien eines anderen Genus (anderer Genera) als *Pseudomonas* angehören.

3. Nucleinsäuremolekül, dadurch gewinnbar, daß man von mehreren Stämmen ausgeht, die einer nachzuweisenden und einer nicht-nachzuweisenden Gruppe von Bakterien des Genus *Pseudomonas* angehören,

- (a) in an sich bekannter Weise aus einem *Pseudomonas*-Stamm dieser Gruppen (erster Stamm) genomische DNA isoliert,
- (b) in an sich bekannter Weise die 23S/5S-intergenische Region gegebenenfalls mit dem direkt angrenzenden 23S-Bereich und/oder dem direkt angrenzenden 5S-Bereich amplifiziert und das Amplifikationsprodukt gewinnt (erstes Amplifikationsprodukt),
- (c) mit einem zweiten, dritten,..... und/oder nten *Pseudomonas*-Stamm dieser Gruppen jeweils gemäß Stufen (a) und (b) genomische DNA isoliert, die 23S/5S- intergenische Region mit dem direkt angrenzenden 23S-Bereich und/oder dem direkt angrenzenden 5S-Bereich amplifiziert und das Amplifikationsprodukt gewinnt (zweites, dritttes, ..... ntes Amplifikationsprodukt),
- (d) in an sich bekannter Weise die DNA-Sequenz von gemäß (b) und (c) gewonnenen Amplifikationsprodukten bestimmt und die DNA-Sequenz des Amplifikationsproduktes gemäß (b) mit der DNA-Sequenz eines oder mehrerer Amplifikationsprodukte gemäß (c) vergleicht und
- (e) als Primer oder als Sonde ein Nucleinsäuremolekül in an sich bekannter Weise gewinnt, mit dessen Hilfe sich die nachzuweisende Gruppe von Bakterien des Genus *Pseudomonas* von der nicht-nach-zuweisenden Gruppe von Bakterien des Genus *Pseudomonas* anhand von Unterschieden an mindestens einer Nukleotidposition im Sequenzbereich des Nucleinsäuremoleküls unterscheiden läßt.

4. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1 oder 3, dadurch gewinnbar, daß man von Stämmen ausgeht, die einer nachzuweisenden Gruppe von Bakterien der Species *Pseudomonas aeruginosa* und einer nicht-nachzuweisenden Gruppe von Bakterien anderer Species angehören.

5. Nucleinsäuremolekül insbesondere nach einem der vorhergehenden Ansprüche der SEQ ID NO 1 oder der hierzu komplementären Sequenz.

6. Nucleinsäuremolekül mit gegenüber einem Nucleinsäuremolekül gemäß Anspruch 5 verkürzter Sequenz, und zwar der Sequenz des Bereiches oder im Bereich der Nukleotidpositionen 12 bis 131.

7. Nucleinsäuremolekül mit gegenüber einem Nucleinsäuremolekül gemäß Anspruch 5 verkürzter Sequenz, nämlich

- (i) der SEQ ID NO 3 oder
- (ii) der SEQ ID NO 4 oder
- (iii) der SEQ ID NO 5 oder
- (iv) der zu (i), (ii) und (iii) jeweils komplementären Sequenz.

8. Nucleinsäuremolekül der SEQ ID NO 2 oder der hierzu komplementären Sequenz.

9. Nucleinsäuremolekül, dadurch **gekennzeichnet**, daß es hinsichtlich seiner Sequenz bei mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden seiner Nukleotidkette

- (i) mit einem Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche identisch ist oder
- (ii) in 9 von 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden mit einem Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche übereinstimmt oder
- (iii) in 8 von 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden mit einem Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden

Ansprüche übereinstimmt oder

- (iv) zu mindestens 90 % mit einem Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche homolog ist.

10. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 9, dadurch **gekennzeichnet**, daß es 10 bis 250 und vorzugsweise 15 bis 30 Nukleotide lang ist.

11. Nucleinsäuremolekül nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch **gekennzeichnet**, daß es einzelsträngig oder doppelsträngig vorliegt.

12. Nucleinsäuremolekül nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch **gekennzeichnet**, daß es

- (i) als DNA oder  
(ii) als (i) entsprechende RNA oder  
(iii) als PNA vorliegt,

wobei das Nucleinsäuremolekül gegebenenfalls in einer für analytische Nachweisverfahren, insbesondere auf Basis von Hybridisierung und/oder Amplifizierung, an sich bekannten Weise modifiziert ist.

13. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 12, dadurch **gekennzeichnet**, daß das Nucleinsäuremolekül dadurch modifiziert ist, daß bis zu 20 % der Nukleotide von mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden seiner Nukleotidkette, insbesondere 1 oder 2 Nukleotide, durch für Sonden und/oder Primer an sich bekannte analoge Bausteine ersetzt sind, insbesondere durch Nukleotide, die bei Bakterien nicht natürlich vorkommen.

14. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 12 oder 13, dadurch **gekennzeichnet**, daß das Nucleinsäuremolekül dadurch oder zusätzlich dadurch modifiziert bzw. markiert ist, daß es in einer für analytische Nachweisverfahren an sich bekannten

Weise eine oder mehrere radioaktive Gruppen, farbige Gruppen, fluoreszierende Gruppen, Gruppen zur Immobilisierung an fester Phase und/oder Gruppen für eine indirekte oder direkte Reaktion, insbesondere eine enzymatische Reaktion, insbesondere mit Hilfe von Antikörpern, Antigenen, Enzymen und/oder Substanzen mit Affinität zu Enzymen oder Enzymkomplexen, und/oder anderweitig modifizierende oder modifizierte Gruppen nucleinsäureähnlichen Aufbaus aufweist.

15. Ein oder mehrere Nucleinsäuremoleküle gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche in Gegenwart fakultativer Hilfsstoffe und in Form eines Kits für analytische Nachweisverfahren, insbesondere zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Pseudomonas*.

16. Verwendung ein oder mehrerer Nucleinsäuremoleküle gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14 oder in Form eines Kits gemäß Anspruch 15 zum Nachweis der An- oder Abwesenheit von Bakterien, welche einer Gruppe von Bakterien der Gattung *Pseudomonas* angehören.

17. Verwendung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Gruppe von Bakterien der Gattung *Pseudomonas* verschiedene Stämme von *Pseudomonas aeruginosa* umfaßt oder durch diese Stämme gebildet wird.

18. Verwendung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Gruppe von Bakterien der Gattung *Pseudomonas* ausschließlich um *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme handelt.

19. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 18, dadurch **gekennzeichnet**, daß man eine Nucleinsäurehybridisierung und/oder eine Nucleinsäureamplifikation durchführt.

20. Verwendung nach Anspruch 19, dadurch **gekennzeichnet**, daß

man eine Polymerase-Kettenreaktion als Nucleinsäureamplifikation durchführt.

21. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 20, dadurch **gekennzeichnet**, daß man den Nachweis dadurch durchführt, daß man die nachzuweisenden Bakterien von nicht-nachzuweisenden Bakterien anhand von Unterschieden der genomischen DNA und/oder RNA an mindestens einer Nukleotidposition im Bereich eines Nucleinsäuremoleküls gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14 unterscheidet.

22. Verwendung nach Anspruch 21, dadurch **gekennzeichnet**, daß man anhand von Unterschieden im Bereich eines Nucleinsäuremoleküls gemäß Anspruch 5 unterscheidet.

**Zusammenfassung**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Nucleinsäuremolekül bzw. -moleküle sowie ein Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Pseudomonas*, insbesondere *Pseudomonas aeruginosa*. Ferner ist Gegenstand der Erfindung ein Testkit bzw. Testkits zur Durchführung der genannten Nachweisverfahren.

09/508238

514 Rec'd PCT/PTO 09 MAR 2000

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

(A) NAME: BioteCon Gesellschaft fuer Biotechnologische  
Entwicklung und Consulting mbH  
(B) STRASSE: Tegeler Weg 33  
(C) ORT: Berlin  
(E) LAND: Deutschland  
(F) POSTLEITZAHL: 10589

(A) NAME: Kornelia Berghof  
(B) STRASSE: Rhodelaenderweg 85  
(C) ORT: Berlin  
(E) LAND: Deutschland  
(F) POSTLEITZAHL: 12355

(A) NAME: Alexander Gasch  
(B) STRASSE: Steegerstr. 71  
(C) ORT: Berlin  
(E) LAND: Deutschland  
(F) POSTLEITZAHL: 13359

(A) NAME: Anja Braeuer  
(B) STRASSE: Residenzstr. 100  
(C) ORT: Berlin  
(E) LAND: Deutschland  
(F) POSTLEITZAHL: 13409

(A) NAME: Cordt Groenewald  
(B) STRASSE: Elberfelder Str. 12  
(C) ORT: Berlin  
(E) LAND: Deutschland  
(F) POSTLEITZAHL: 10555

(A) NAME: Freimut Wilborn  
(B) STRASSE: Neue Kantstr. 9  
(C) ORT: Berlin  
(E) LAND: Deutschland  
(F) POSTLEITZAHL: 14057

(A) NAME: Arndt Rolfs  
(B) STRASSE: Schroederstr. 39  
(C) ORT: Rostock  
(E) LAND: Deutschland  
(F) POSTLEITZAHL: 18055

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Nucleinsaeure-Sequenzen und Verfahren zum  
Nachweis von Bakterien der Gattung Pseudomonas

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 5

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

(A) DATENTRÄGER: Floppy disk  
(B) COMPUTER: IBM PC compatible  
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS  
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(v) DATEN DER JETZIGEN ANMELDUNG:  
ANMELDENUMMER: WO 98/05738

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 131 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonukleotid"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

ATAACACCCA AACAAATCTGA YGATTGTGTG TTGTAAGGTG AAGTCGACGA ACCGAAAGTT 60

CGCATGAACC GCAAACACCT TGAAATCACA TACCTGAATC CGGATAGACG TAAGCCCAAG  
120

CGAACGGATA T 131

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonukleotid"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

GATAGGCTGG GTGTGTAAGC 20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonukleotid"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

CTTGGGCTTA CGTCTATCCG 20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 13 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure  
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonukleotid"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

TGATTCAAG GTG

13

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 23 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure  
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonukleotid"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

GACGATTGTG TGTGTAAAGG TGA

23